分子生物技術在藥用植物之應用研究

鄭可大[1] 劉新裕[2] 蔡新聲[2]

[1] 私立臺北醫學院生化學科
[2] 臺灣省農業試驗所農藝系

摘 要

藥用植物資源的開發與利用，為我國加入 GATT 後，發展精緻農業重要的一環。其種源庫的建立，目前已初具成果。惟收集品種繁多，為了有效釐清藥用植物的基原，分子生物技術實為一準確的方法。本研究利用快速且簡便的逢機擴增多型性去氧核醣核酸(RAPD)指紋分析技術，針對金線蓮、山藥及柴胡，篩選各品種（系）的特異性遺傳標誌，定其親源關係，以作為今後育種的參考。同時，以差異性表現等生物技術，尋找影響活性成份生合成的基因，作為轉殖的研究，現在正積極著手中。除此之外，中藥材的 DNA 鑑定，亦以 RAPD 及 PCR-SSCP 技術，進行黃連、黃耆、冬蟲夏草、當歸、枸杞及柴胡的分析。

逢機擴增多型性去氧核醣核酸(random amplified polymorphic DNA, RAPD)指紋分析自 1990 年(Williams; Welsh and McClelland)發展至今，已被廣泛應用於各生物領域的研究之中。該技術經 PCR (polymerase chain reaction) 修改而成，其與 PCR 的差別在於該反應僅用一條引子，且此引子只有 10 個核甘酸，它所擴增的 DNA 片段並非如 PCR 用兩條特定序列的引子，複製 DNA 上特殊的片段，而是任意序列逢機複製與其煉合(anneal)的不特定片段。因此該反應的煉合溫度較低，僅 36-40 ℃，並非如 PCR 的 55-68 ℃之間。該技術最大的特色在於它不須預先得知所欲測試材料的基因序列資料，就可以任意序列的引子擴增 DNA 的片段，將供試材料的 DNA 差異性比較出來。它與其他指紋分析技術比較，其優點包括 (1) 只需極少量的 DNA ，幾個 ng 即可。(2) 操作簡便省時，省工。(3) 無需做選殖。(4) 不須預知序列的資料。因此該技術可在短時間內找到適合要 多型性 DNA 片段，達到分析的目的。

植物間基因組 (genome) 的大小，因重複序列的關係，即使是相近的品種，其差異亦可能甚大。這些變異較大的序列包括 rDNA (ribosomal DNA) (Oxelman, 1996) ，衛星DNA (satellite DNA) (Ramser et al., 1997) 和 VNTR (variable number tandem repeats) (Beyermann et al., 1992)。 Ramser 等人 (1996) 就用一種 RAPD 技術，叫作 RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism)，去偵測各山藥品種之間的差異。以 (GA)8 ，(CA)8，(GTGA)4 ，(GAA)5 等當作探針，對 RAPD 圖譜進行雜合分析。本研究由農試所提供 *Dioscorea alata* 種內的十二個山藥品系(如表一)，分別以 RAPD 的數據分析之。在二十條所篩選的 OPP引子中，有十四條顯現多型性圖譜，將這些引子共得到的 180 個標誌(如表二)，進行 PAUP (phylogenetic analysis using parsimony) 分析，計算各品系之間的遺傳距離，並訂出其親源關係樹狀圖。結果我們發現，最大的爲 0.494 ，出現在台東白肉品系 70W03 及埔里紅肉品系 70R01 之間， 70W03 爲 *Dioscorea alata* ， 70R01 爲 *Dioscorea alata* var. *purpurea* 。而遺傳距離最小的爲 0.317 ，出現在兩個汕頭白肉品系 70W33 及 70W35 之間，它們均爲 *Dioscorea alata* 。其他品系之間的遺傳距離則自 0.322 至 0.478 不等。除此之外，由親源分析所得到的樹狀圖(如圖一)亦顯示各品系之間的關係，該分析以源自千里達的台農一號爲外源種 (out group)，其中較爲相近的品系分爲五組，第一組爲兩個來自汕頭的白肉品系，第二組爲來自嘉義的兩個紅肉品系，第三組爲來自嘉義的兩個白肉品系，第四組爲南投的白肉及埔里的紅肉品系，第五組爲北投的白肉及南投的紅肉品系。除兩個汕頭品系之外，台東品系在台灣東部，其餘八個品系均位於台灣西部地區。以此十二個山藥品系分析的結果來看， 96% 的 RAPD 標誌呈現多型性，比過去文獻所報導的

其他植物品種的差異性大，如芹菜 (Vierling et al., 1994) 、高粱 (Yang and Quiros, 1993) 等。

RAPD亦被應用於臺灣金線連與高雄金線連品種的鑑定上。臺灣金線連與高雄金線連的莖部及葉部雖各有其典型特徵，但以此爲分類依據，卻往往造成誤判。而其花部形態最主要的差別在於臺灣金線連的花部唇瓣上具有梳狀構造，花瓣朝下，而高雄金線連無梳狀構造，且花瓣朝上（如圖二）。此外，我們亦發現另有少數金線連植株的花部特徵介於這兩種金線連之間 - 有梳狀構造，但花瓣朝上。 RAPD 分析爲金線連品種的鑑定，提供了一個既快速又簡便的工具。本研究即針對該目的，進行四十條引子的篩選，結果自八條引子，得到共十九個具有種特異性的標誌，其中九個標誌專一於臺灣金線連，另十個標誌則專一於高雄金線連。在這八條引子當中， OPC-08 及 OPL-07 的 RAPD 圖譜均產生專一於臺灣金線連與高雄金線連的標誌，且這些標誌又同時出現於雜交植株的圖譜之中。 RAPD 分析使金線連的品種無需俟其開花始可確定，只要取其葉部，抽取 DNA ，即可鑑定之。 RAPD 標誌的篩選，將有利於今後藥用植物育種之用。

除了在藥用植物的應用之外， RAPD 亦被用於中藥材基源的鑑定上。中國的中藥材約有 12000 之多，涵蓋範圍包括動物、植物、礦物及眞菌等，其中植物佔 80% 以上。植物可供藥用的部分從根、莖、葉、花、果實到種子，無一不包括在內。由於藥用成分的含量不定，中藥材的品質不一，因此，中藥的品管應從基源著手，始可有效達成中藥科學化的目的。本研究利用 RAPD 技術鑑別中藥材的品種、眞僞及組成份，試圖爲藥材的品管，在組織鏡檢、化學分析之外，再開創一個可以有效運用的工具。目前完成 DNA 分析的藥材包括黃連 (Cheng et al., 1997) 、柴胡 (Cheng et al.) 、黃耆 (Cheng et al.; Lin et al., 1995; Tseng et al., 1991) 、冬蟲夏草 (Cheng et al., 1998) 、當歸 (Cheng et al.) 、枸杞 (Cheng et al.) 等，其他數種市售的藥材，現在正在分析中。除單方藥材之外，複方藥材的成份分析，亦可藉由該技術，加以確認。我們已同時鑑定玉屏風散中的黃耆、白朮及防風三成份 (Cheng et al., 1998)，現正進行止嗽散中七種藥材成份之鑑定工作。抽取藥材 DNA 的方法步驟如下 (Rogers and Bendich, 1985) ：

1. 稱取 0.1 克的中藥材，加 1 毫升的 1x CTAB extraction buffer ：

50mM Tris-HCl , pH8.0
0.7M NaCl
10mM EDTA
20mM 2-ercaptoethanol
1% CTAB

2. 56 ℃ ,30 分鐘。

3. 置於室溫中，俟其回溫。

4.以一倍體積的chloroform/isoamyl alcohol = 24:1萃取一次。
5. 13000 x g 離心 10 分鐘。
6.吸取水層。
7.加 1/10 體積的 10% CTAB 。
8.室溫中放置 10 分鐘。
9.以一倍體積的chloroform/isoamyl alcohol = 24:1萃取後離心。
10.吸取水層。
11.加一倍體積的 1x CTAB precipitation buffer：
50mM Tris-HCl，pH8.0
10mM EDTA
1% CTAB
12.室溫中放置 30 分鐘。
13.在 20 ℃，13000 x g 離心 25 分鐘。
14.以 70% 酒精洗沉澱物。
15.溶於 TE 緩衝液中。

RAPD 反應條件:

成　　份	體　積(ul)	最終濃度
H_2O	17.375	
10X PCR buffer	2.5	1X
2.5 mM dNTP	2	0.1 mM
10 μM primer	2	0.2 μM
5 U/μl T*aq.*	0.125	2.5 U/100 μl
x ng/μl DNA	1	
Total	25	

94℃, 2 min.

94℃, 30 sec.
40℃, 40 sec. → 3 cycles
72℃, 50 sec.

94℃, 20 sec.
45℃, 40 sec. → 37 cycles
72℃, 50 sec.

72℃, 7 min.

4℃, ∞

圖三即為各黃連品種的乾燥根莖，以引子 OPP-05 進行 RAPD 分析所得到的 DNA 圖譜。圖四為市售柴胡以引子 OPD-01 進行 RAPD 分析所得到的 DNA 圖譜。而圖五為冬蟲夏草眞偽品的 OPT-13 RAPD DNA 圖譜。我們希望在今後的研究中，能收集更完全的中藥材樣品，篩選出足以鑑別其基源的 RAPD 引子，並更進一步設計有效的 PCR 特異性引子，建立完整的藥材 DNA 指紋分析圖譜，作為中藥基源品質管制之用。此外，簡化 DNA 抽取程序，甚至直接自藥材中進行 PCR 反應 (Panaccio et al., 1993; Thomson and Henry, 1995)，將有助於提升該技術的應用潛力。在未來十年之內，以生物科技的方法，快速且有效的將科學複方中藥的品質加以分級，亦是我們努力的重點之一。

中藥品質管制是衛生署即將執行的重點工作之一，為達成此一目標，除與大陸有關當局建立密切合作管道之外，更多生技人才加入研究的行列，發揚傳統中藥在世界的地位，使人類更有能力應付疾病的挑戰。

參考文獻

1. Beyermann, B.,Nurnberg,P.,Weihe, A., Meixner, M., Epplen, J. T., Borner, T. 1992. Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for

simple repetitive DNA sequences. Theoretical and Applied Genetics 83, 691-694.

2. Cheng, K. T.,Chang, H. C., Liu, S. Y., Su, B. C. Genetic variations of Bupleurum medicines revealed by RAPD analysis. (submitted).

3. Cheng, K. T., Chang, H. C., Su, C. H., Hsu, F. L. 1997.Identification of dried rhizomes of Coptis species using random amplified polymorphic DNA. Botanical Bulletin of Academia Sinica 38, 241-244.

4. Cheng, K. T., Chen, C. T., Hsu, F. L, Chang, W. W. RAPD analysis of Astragalus medicines in Taiwan market. (submitted).

5. Cheng, K. T., Huang, H., Tzeng, C. H. RAPD analysis of Lycium barbarum medicine in Taiwan market. (submitted).

6. Cheng , K. T., Su, C. H., Chang, H. C., Huang, J. Y. 1998. Differentiation of genuines and counterfeits of Cordyceps species using random amplified polymorphic DNA. Planta Medica 64, 451-453.

7. Cheng, K. T., Tsay, H. S., Chen, C. F., Chou, T. W. 1998. Determination of the components in a Chinese prescription, Yu-Ping-Feng San, by RAPD analysis. Planta Medica 64, 563-565.

8. Cheng, K. T., June, C. P., Yeh, S. X. RAPD analysis of Angelica sinensis medicine in Taiwan market. (submitted).

9. Lin, Y. C., Chang, Y. S., Tsay, H. S. 1995. Pharmacognostical studies on Astragali Radix (I) Identification of Astragalus membranaceus, A. mongbolicus and Hedysarum polybotrys. Journal of Agricultural Research of China 44, 101-113.

10. Oxelman, B. 1996. RAPD patterns, nrDNA ITS sequences and morphological patterns in Silene section Sedoideae (Caryophyllaceae). Plant Systematics and Evolution 201, 93-116.

11. Panaccio, M., Georgesz, M., Hollywell, C., Lew, A. 1993. Direct PCR from solid tissues without DNA extraction. Nucleic Acids Research 21,4656.

12. Ramser, J., Lopez-Peralta, C., Wetzel, R., Weising, K., Kahl, G. 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (Dioscorea bulbifera L.) detected by random amplified polymorphic DNA. Genome 39, 17-25.

13. Ramser, J., Weising, K., Chikaleke, V., Kahl, G. 1997. Increased informativ

eness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. BioTechniques 23, 285-290.

14.Rogers, S. O., Bendich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology 5, 69-76.

15.Thomson, D., Henry, R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. BioTechniques 19, 394-400.

16.Tseng, J. H., Lin, L. D., Wen, G. C. 1991. Studies on pharmacognostical and chemical identification of Coptidis Rhizoma, Astragali Radix and Bupleuri Radix in Taiwan market. Annual Scientific Report National Laboratory of Foods and Drugs Department of Health, Executive Yuan 9,159-179.

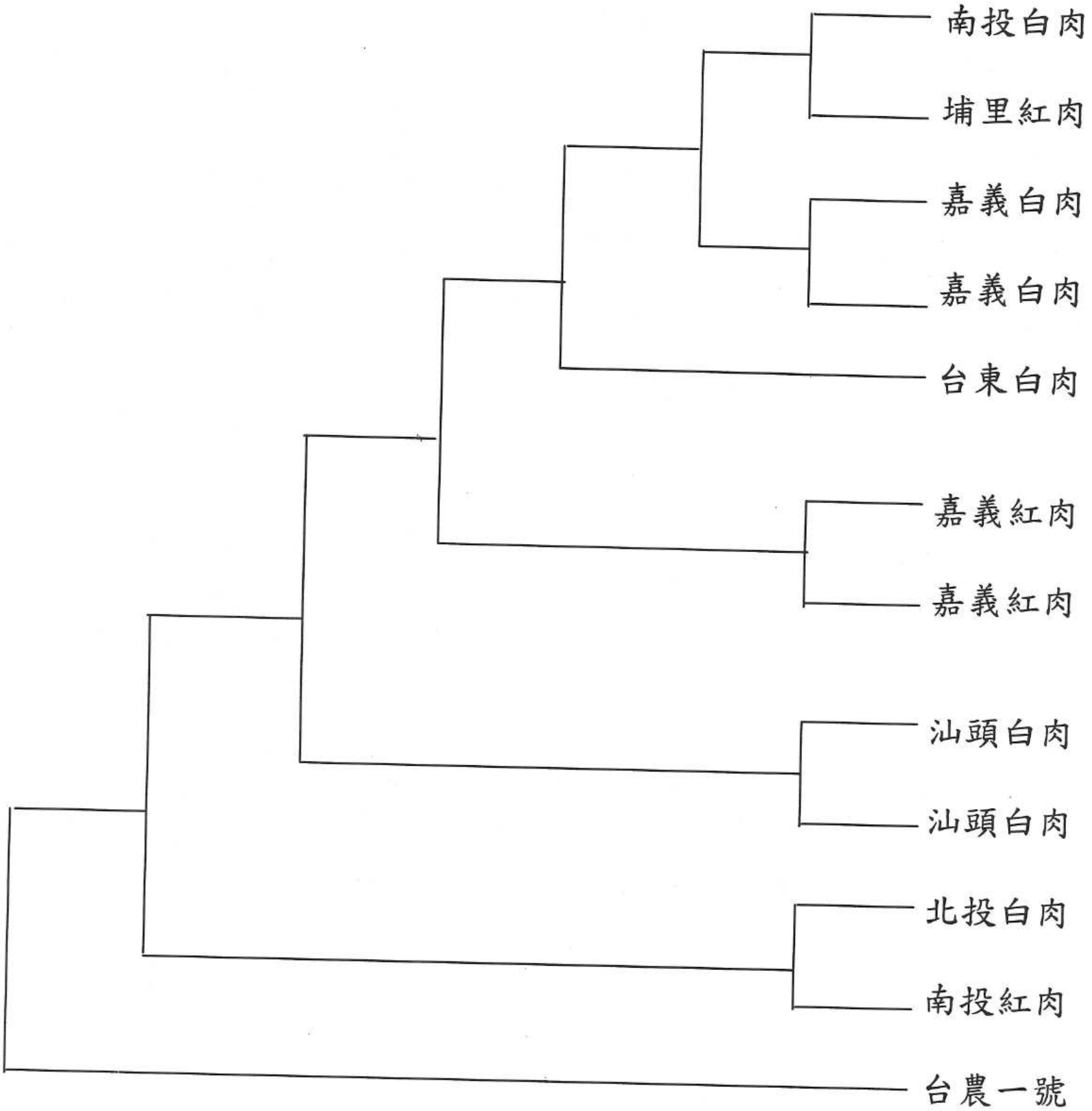
17.Yang, X.; Quiros, C. Identification and Classification of Celery Cultivars With RAPD Markers. Theor. Appl. Genet. 1993, 86, 205-212.

18.Vierling, R.A.; 'Xiang, Z.; Jishi, C.P.; Gilbert, M.L.; Nguyen, H.T. Genetic diversity aming Elite Sorghum Lines Revealed by Restriction fragment Length Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNAs. Theor. Appl. Genet. 1994, 87, 816-820.

19.elsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18, 7213-7218.

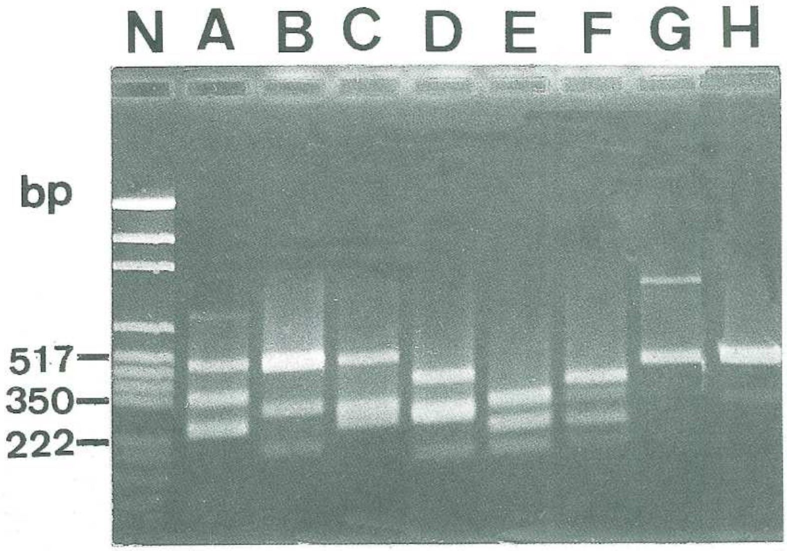
20.Williams, C. E., Ronald, P. C. 1994. PCR template-DNA isolated quickly from monocot and dicot leaves without tissue homogenization. Nucleic Acids Research 22, 1917-1918.

21.Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18, 6531-6535.

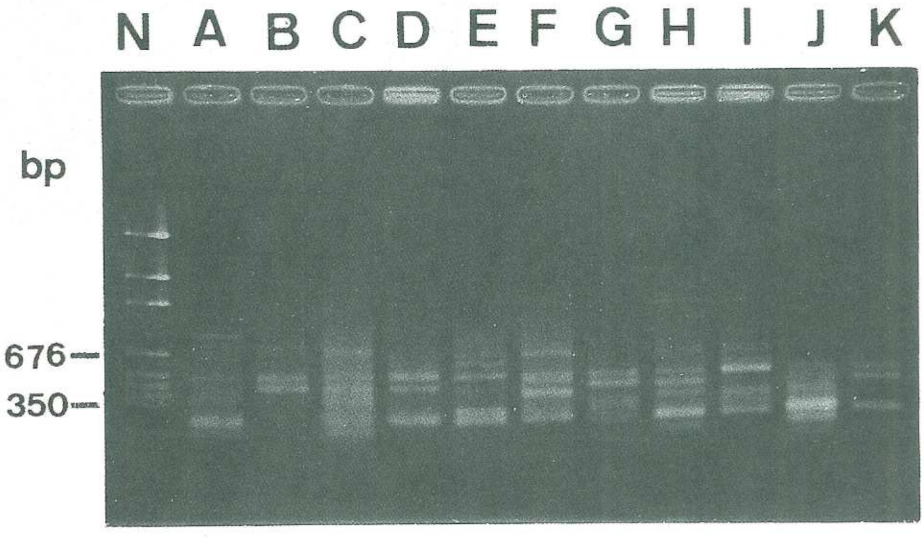


圖一、本研究十二個山藥供試品系的 RAPD 親源樹狀圖。

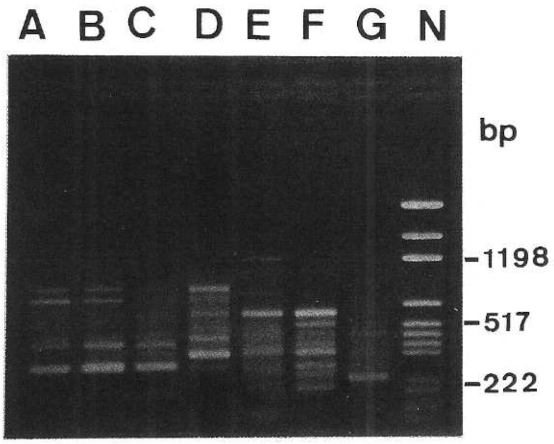
圖二、左圖為臺灣金線連花部形態，中圖為雜交種金線連花部形態，右圖為高雄金線連花部形態。



圖三、以引子 OPP-05 對各品種黃連進行 RAPD 分析所得到的 DNA 指紋分析圖譜。 N 爲 DNA 標誌，A爲味連，B爲雅連，C爲雲連，D爲野連，E爲臺灣五加葉黃連，F爲日本丹波黃連，G爲美國黃連， H 爲印度黃連。



圖四、十一個市售柴胡樣品之OPD-01 RAPD指紋分析圖譜。 N 爲 DNA 標誌，A至 J 爲十一家市售柴胡。



圖五、冬蟲夏草眞僞品之OPT-13 RAPD指紋分析圖譜。 N 爲 DNA 標誌，A 爲四川產冬蟲夏草，B 爲青海產冬蟲夏草，C 爲西藏產冬蟲夏草，D 爲亞香棒蟲草，E 爲草石蠶，F 爲地蠶，G 爲不加 DNA 之空白組。

表一、本研究十二個山藥供試品系的來源及代號。

品系代號	學　名	來　源
70W04	*Dioscorea alata*	南　投
70W02	*Dioscorea alata*	嘉　義
70W48	*Dioscorea alata*	北　投
70W33	*Dioscorea alata*	汕　頭
70W35	*Dioscorea alata*	汕　頭
70W46	*Dioscorea alata*	嘉　義
Tainung No. 1	*Dioscorea alata*	千里達
70R16	*Dioscorea alata* var. *purpurea*	臺　東
70R01	*Dioscorea alata* var. *purpurea*	埔　里
70R04	*Dioscorea alata* var. *purpurea*	嘉　義
70R07	*Dioscorea alata* var. *purpurea*	南　投

表二、本研究篩選出的引子所產生之多型性標誌數。

引子代號	序　　　列	多型性標誌數目
P-02	5'TCGGCACGCA3'	14
P-05	5'CCCCGGTAAC3'	15
P-06	5'GTGGGCTGAC3'	12
P-07	5'GTCCATGCCA3'	6
P-09	5'GTGGTCCGCA3'	13
P-11	5'AACGCGTCGG3'	15
P-12	5'AAGGGCGAGT3'	10
P-13	5'GGAGTGCCTC3'	11
P-14	5'CCAGCCGAAC3'	7
P-15	5'GGAAGCCAAC3'	9
P-16	5'CCAAGCTGCC3'	15
P-17	5'TGACCCGCCT3'	18
P-18	5'GGCTTGGCCT3'	19
P-19	5'GGGAAGGACA3'	16
總 和		180

Applications of Biotechniques to the Medicinal Plants

Kur-Ta Cheng[1], Sin-Yie Liu[2], and Hsin-Sheng Tsay[2]

[1] Department of biochemistry, Taipei Medical College, Taipei, Taiwan, ROC

[2] Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC

Abstract

The development and utilization of medicinal plants as resources is one of important strategies in Taiwan after the admission of the General Agreement on Traiffs and Trade (GATT). The germplasmic bank of medicinal plants has been well established during the past two years. Molecular biological techniques are reliable approaches to clarify the taxonomic levels of the medicinal plants. In our studies, a rapid and sensitive tool of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to construct the phylogenic relationships among the collected plant species and to screen species-specific (or line-specific) markers of some *Anoectochilus* species, *Dioscorea* species, or *Bupleurum* species. In addition, for transgenic purpose, differential display technique was also adapted to obtain the gene which is involved in the biosynthesis pathway of the active compound. On the other hand, the authentication of dried Chinese herbal medicines, namely, Rhizoma Coptidis, Radix Astragali, Cordyceps, Radix Angelica Sinensis, Fructus Lycii, and Radix Bupleuri, were performed by using the RAPD and the PCR (polymerase chain reaction) - SSCP (single strand conformation polymorphism) techniques.